Aus der Kinder-Klinik der Universität
des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. J.B. Mayer

und

dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie

Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Zimmermann
Leiter der Virologischen Abteilung: Prof. Dr. med. R. Wigand

Untersuchung über die Beeinflussung des Bacterium bifidum durch Viren in vitro.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1968

vorgelegt von
Pia Wachter

geb. am 1. Mai 1943 in St.Wendel

Dekan: Prof. Dr. med. H. Witter
Referent: Prof. Dr. med. J.B. Mayer

Aus der Kinder-Klinik der Universität
des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. J.B. Mayer

und

dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie

Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Zimmermann
Leiter der Virologischen Abteilung: Prof. Dr. med. R. Wigand

Untersuchung über die Beeinflussung des Bacterium bifidum durch Viren in vitro.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1968

vorgelegt von
Pia Wachter

geb. am 1. Mai 1943 in St.Wendel

Dekan: Prof. Dr. med. H. Witter
Referent: Prof. Dr. med. J.B. Mayer

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 24. Oktober 1968 abgelegt.

G l i e d e r u n g

I. Einleitung
1) Morphologie
2) Züchtung
3) Typeneinteilung
4) Vorkommen
5) Bedeutung

II. Fragestellung

III. Material und Methodik der eigenen Versuche

IV. Vorversuche

V. Hauptversuche

VI. Diskussion

VII. Zusammenfassung

VIII. Literaturnachweis

IX. Danksagung

X. Lebenslauf

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552721_0064

Das auffällige Phänomen des Überwiegens des Bacterium bifidum (Lactobacillus bifidus) in der Dickdarmflora des Brustkindes ist über 5o Jahre bekannt, und seit dieser Zeit haben sich zahlreiche Forscher mit diesem Phänomen beschäftigt. Die meisten von ihnen, vor = wiegend Pädiater, sahen in dieser Bifidum = flora einen Indikator für das Wohlergehen des Säuglings. MAYER weist ihr dagegen eine aktive Funktion zu.

Morphologie :

Das Bacterium bifidum (B.b.) ist ein unbewegliches, gram-positives, nicht sporen = bildendes Stäbchen. Seine Länge schwankt zwischen 2 - 5μ und seine Dicke zwischen o,5 - o,7μ . Es steht hinsichtlich seines Formenreichtums an der Spitze aller Bakterien (MAYER, MOSER, DITTMANN, UMLAUF).
Das wesentlichste und konstanteste Merkmal jedoch ist die unregelmäßige, gewellte äußere Kontur, die bei keiner Züchtungs = methode verlorengeht.(MAYER). Sehr junge und auch ältere Keime können auch im Stuhl gram-negativ erscheinen. Im Brustmilchstuhl zeigt es sich als kompaktes, leicht gekrümmtes Stäbchen, teilweise gebändert mit vereinzelten Volutinkörperchen oder mit angedeuteter Kolbenform und mit vereinzelten Verzweigungen (MAYER). "In flüssigen Nährböden finden wir lange und kurze, gebogene und mehr gerade, stark und wenig gefleckte Stäbchen. Die gram-positive Substanz ist häufig aufgelockert und nur in Form von mittel-, end- oder rand-ständigen Volutinkörperchen zu sehen. Dieser Pleomorphismus ist der Ausdruck der Anpassungs fähigkeit an ein verändertes Milieu" (MAYER)

Vorkommen :

Schon TISSIER konnte das B.b. in den Faeces des gesunden Brustkindes in den ersten Tagen nach der Geburt nachweisen. Bei unreifen Neugeborenen ist die Entwicklung einer Bifidumflora verzögert. Im Darm des Flaschenkindes ist sie zwar auch vorhanden aber in einem viel geringeren Ausmaß. Nach BOVENTER stellt das B.b. ein nahezu konstantes Mitglied der Scheidenflora dar. Weiterhin findet man es fast immer in der Brustdrüse, im Colostrum und in der Frauenmilch.
" Mit den Befunden von MOSER ist eindeutig sichergestellt, daß die Infektion des kindlichen Darmes mit B.b. auf oralem Wege über die mütterliche Brust, das Colostrum und die Frauenmilch erfolgt " (MAYER).

Typeneinteilung :

Die Einteilung des B.b. in verschiedene Typen ist noch unvollständig, und die Bedeutung der einzelnen Typen für den Säugling noch nicht geklärt.
KENDALL und HANER fanden 1924 vier Typen, MAYER und MOSER 1950 drei Haupttypen und eine Untergruppe, DEHNERT 1957-1961, der sich am intensivsten mit diesem Problem beschäftigt hat, vier Keimgruppen mit insgesamt 9 Biotypen und 14 Serotypen. Auch durch zahlreiche andere Forscher, wie SEELIGER und WERNER 1962/63 und LERCHE, REUTER 1961/63, konnte keine befriedigende Ordnung geschaffen werden (MAYER).

Züchtung :

Zur Herauszüchtung des B.b. aus dem Stuhl eignet sich am besten das von MAYER modifizierte anaerobe Plattenverfahren nach Fortner. Beim Einbringen von der Platte in flüssige Nährböden zeigt das B.b. zunächst

ein schlechteres Gedeihen. Erst nach einigen Passagen gewöhnt es sich an den neuen Nährboden. Das Annehmen und Wiederverlieren von Eigenschaften unter verschiedensten Bedingungen ist für das B.b. charakteristisch. Die Weiterzüchtung gelingt schließlich in flüssigen Nährböden unter aeroben Bedingungen genau so gut wie unter anaeroben. Der Beweis für aerobes Wachstum ließ sich dadurch erbringen, daß gezeigt werden konnte, daß das B.b. im Warburggerät einen starken O_2-Verbrauch hat (MAYER, DITTMANN, UMLAUF). Die Autoren ließen bei diesen Versuchen mit eigenen Stämmen den Original-Tissier-Stamm aus dem Institut Pasteur mitlaufen. Dieser, wie auch die anderen Stämme, wuchsen schließlich aerob ebenso gut wie anaerob, waren erst katalase-negativ, dann positiv, bildeten CO_2 und verbrauchten O_2. Das optimale Wachstum des B.b. liegt bei p_H 5,5-5,9.

Bedeutung :

Physiologischerweise ensteht nur nach Frauenmilchernährung eine gute Bifidumflora im Darm des Säuglings. Diesen bifidogenen Effekt versucht man heute durch Zugabe von verschiedensten Substraten zu künstlichen Nahrungsgemischen zu erzielen. Der Endzweck ist, über den Weg dieser "Eubiose" (MAYER), das Gedeihen des Kindes zu fördern (ADAM, MAYER) .

Obwohl ein antibiotischer Mechanismus des B.b. ganz allgemein abgelehnt wird, konnte MAYER als erster nachweisen, daß das B.b. in steriler Milch bei Zusatz von Hefe = autolysat, Pepsin und Pepton eine verdrängende Wirkung auf Colibakterien, Proteusbakterien, Pneumococcus mucosus und Bac. mesentericus ausübt, nicht aber auf

Streptokokken und Staphylokokken.
Die Untersuchungen von BIRKENBACH sprechen für eine antagonistische Wirkung des B.b. gegenüber verschiedenen Dyspepsie-Coli-Typen. MAYER, CATEL und KLING vermuten, daß das von B.b. erzeugte saure Milieu im Dickdarm, das Wachstum jeder anderen Dickdarmflora, hauptsächlich der Coli-Bakterien, sehr stark hemmt, ja sogar unterdrückt.
Weiter gilt heute als erwiesen, daß das B.b. größere Mengen von Vitamin B_1 (REICHELT), Vitamin B_2 (BOVENTER) und Vitamin K (ORLA-JENSEN) synthetisieren kann. Ob diese Vitamine vom Dickdarm aus resorbiert werden und damit dem Organismus zur Verfügung stehen, ist noch nicht geklärt.
THURAU glaubt auf Grund eingehender Unter = suchungen, daß das B.b. für eine bessere Aufspaltung des Nahrungseiweisses im Darm verantwortlich ist und damit eine bessere intermediäre Verwertung desselben garantiert.
Ob das B.b. auch essentielle Aminosäuren dem Säuglingsorganismus zur Verfügung stellt, ist bisher noch unbekannt. ROMAHN konnte zwar zeigen, daß außer Tryptophan alle essentiellen Aminosäuren im Bakterienhydroly = sat vorhanden sind, wobei der hohe Cystin - Gehalt besonders auffallend ist. Es dürfte sich also bei dem Bifidum-Eiweiß um ein biologisch hochwertiges Eiweiß handeln. Über die Resorption dieser Aminosäuren wissen wir jedoch nichts.

Fragestellung :

Die Darmflora des gesunden Säuglings befindet sich in einem individuellen Gleichgewicht, das heißt, es besteht eine bestimmte Relation zwischen den verschiedensten gram-positiven und gram-negativen Darmbakterien, unter denen die "Eubionten" (MAYER) eine Sonderstellung einnehmen. Dieser Gleich = gewichtszustand ist abhängig

1. von der laufenden Aufnahme verschiedener Keime mit der Nahrung
2. von der Zusammensetzung der im Darm als Nährmedium dienenden Nahrung
3. vom Funktionszustand des Magen-Darm-Kanales.

Dieses Gleichgewicht ist jedoch verhältnis = mäßig labil und kann durch die verschie = densten Ursachen mehr oder weniger schnell und schwer gestört werden. Zu den häufigsten Ursachen dieser Störung gehört die orale Infektion mit pathogenen Bakterien oder Viren.

Schon 1949 fand MAYER bei Kindern, die einen viralen Infekt durchmachten, daß die Bifi = dumflora bei absolut gleichbleibender Ernährung zurücktrat - im mikroskopischen Präparat sogar vollends verschwand - um einer vorwiegend gram-negativen Flora Platz zu machen. Nach Abklingen des Infektes wurde sehr rasch wieder die Bifidumflora vorherrschend. Bereits SENGENHOFF, ADAM und später BESSAU hatten auf diese Vorgänge aufmerksam gemacht.

Für den Mechanismus dieser Veränderungen wurden verschiedenartigste Erklärungen gefunden.

1936 sprach BESSAU zwar schon von einem Viruskatarrh des Darmes, fand aber mit

dieser Erläuterung damals sehr wenig Anerkennung.
Inzwischen haben wir durch die Fortschritte der Virologie neue Vorstellungen über den Ablauf einer oralen Virusinfektion beim jungen Säugling. Nach der Infektion ver = mehren sich die Viren auf der Schleimhaut des Nasen-Rachen-Raumes und des Magen-Darm-Kanales wie in einer adaequaten Gewebe = kultur in vitro. Nach der Inkubationszeit, während der sich das Virus in den Zellen vermehrt, kommt es an den Zellen zum cyto-pathogenen Effekt. Damit beginnt die klinische Erkrankung. Das pathologisch - anatomische Substrat hierfür ist die seröse Entzündung, der akute seröse Katarrh. Es kommt dabei an den Schleimhäuten zur Ausscheidung wässrigen Sekrets, dann zu stark vermehrter Schleimabsonderung.
Grundsätzlich herrscht bei solchen Katarrhen die Tendenz vor, die Zellen abzustoßen (BUCHNER). Durch diesen Desquamations = katarrh als Ausdruck des cytopathogenen Ef= fektes, ist der fermentative Abbau der Frauenmilch im Magen-Darm-Kanal im Sinne einer Dyspepsie gestört. Nach MAYER 1965 kann sich das B.b. in diesem veränderten Chymus nicht mehr vermehren.
Diese Erklärung berücksichtigt aber nur die Auswirkung der Virusinfektion im Darm. Sie läßt aber einen möglichen direkten Angriff des Virus auf die Bakterienflora offen. Diese letztere Möglichkeit ist nicht aus der Luft gegriffen, da das Verschwinden des B.b. aus dem Darm bakterioskopisch mit großer Regelmäßigkeit schon 2 - 3 Tage vor der klinischen Manifestierung eines viralen

Infektes beobachtet werden kann.
Es stellte sich uns nun die Frage, ob in vitro bei Anwesenheit von Viren das B.b. geschädigt oder seine Vermehrung unmöglich gemacht wird.

Material und Methodik der eigenen Versuche :

Unsere Versuche machten wir mit zwei verschiedenen Bacterium bifidum Stämmen.

1. B.b. Tissier, der Originalstamm wurde der Universitäts-Kinderklinik Homburg von Professor Prévot, dem Chef du Service des anaérobiens, Institut Pasteur, Paris, 1963 zur Verfügung gestellt.
2. B.b. MAYER 7, der Originalstamm wurde vor über 4 Jahren in der Universitäts-Kinderklinik Homburg aus Brustkindstühlen isoliert.

Beide Stämme werden in der Kinderklinik Homburg unter O_2-Mangel im Fortner-Verfahren auf Leber-Agar-Platten gehalten und zweimal wöchentlich überimpft. Die Leber-Agar-Platte ist die 1937 von BLAUROCK eingeführte Cystin-Milchzucker-Leberagarplatte, der MAYER Wittepepton, Hefeautolysat, Pepsin und Vitamin C hinzufügte.

Zu Beginn der Versuche züchteten wir beide Bakterienstämme auch auf der Leber-Agar-Platte anaerob weiter, wechselten dann aber auf Zeissler- bzw. Blut-Agar-Platten um. Auf den beiden letzten wuchsen die Stämme nach zweimaliger Passage aerob sehr gut weiter, wobei das Nährmedium der Zeissler-Platte etwas bessere Ergebnisse zeigte. Um die Kolonien entstand auf beiden Platten ein durchsichtiger Hof, das Zeichen einer ß-Hämolyse. Die bereits von MAYER aufge = stellte Behauptung, daß das B.b. sowohl anaerob als auch aerob züchtbar sei, konnte somit wieder bestätigt werden.

Bei den Magen-Darm-Erkrankungen des Säuglings spielen zwei große Virusgruppen eine wich = tige Rolle. Die Entero-Viren, zu denen Poliomyelitis-, Echo- und Coxsackie-Viren gehören, besiedeln in der Hauptsache den Darm. Die Adeno-Viren sind sowohl im Nasen-Rachen-Raum als auch im Magen-Darm-Kanal zu finden.

Wir verwendeten für unsere Versuche:

1. Poliomyelitis-Virus, Typ 2, Stamm MEF_1, in einer antibiotikafreien Lösung mit 10^6 bis 10^7 ID_{50} / ml.
2. Adeno-Virus, Stamm Ad 6, ebenfalls in antibiotikafreier Lösung, unverdünnt oder 1:10 verdünnte HeLa-Kulturpassagen.

Beide Stämme waren jeweils bis zum Versuchs = beginn eingefroren. Zur Vermehrung der Viren wählten wir Struma- Kulturen. Die Strumen wurden in der virologischen Abteilung des Instituts für Hygiene, Homburg, aufbereitet, und wir erhielten die Röhrchen mit ein = schichtig ausgewachsenem Zellrasen.

Vorversuche :

Es galt nun zuerst eine Lösung zu finden, in der sich einerseits das B.b. gut ver = mehren konnte und andererseits auch die Zellkulturen, die wir für die Viren benötig= ten, gut erhalten blieben.
Als Ausgangsmedium nahmen wir Lahn'sche Lösung. Diese setzt sich zusammen aus: Hanks'scher Lösung + o,5% Laktalbumin - Hydrolysat.
Die Lösung mußte natürlich antibiotikafrei sein. Dazu gaben wir Kalbsserum (KS) und Natriumthioglycolat (NaTHio).
Nun stellten wir folgende Konzentrationen her:

1. Lahn	ohne KS	ohne NaTHio
2. "	+ 5% "	" "
3. "	ohne KS	+ o,5% "
4. "	" "	+ o,o5% "
5. "	+ 5% "	+ o,5% "

Zur Beobachtung des Bakterienwachstums beimpften wir einen Teil der Röhrchen mit B.b.. Nebenher liefen Kontrollröhrchen, die nicht beimpft worden waren und klar bleiben mußten.
Bei der Beimpfung verrieben wir B.b., die wir von der Fortner-Platte geerntet hatten, in 1 ml Lahn'scher Lösung und gaben davon o,1 ml in die mit 2 ml Medium gefüllten Röhrchen. Danach wurden diese in den Brut = schrank gestellt.
In den beimpften Röhrchen zeigte am 3. Tag eine Trübung der Lösung an, daß sich B.b. vermehrt hatte. Wir hatten zum Vergleich einige Röhrchen Tomarelli-Bouillon beimpft, in der B.b. sehr gut gedeiht.
Nach mehrmaligen Testversuchen erhielten wir die optimale Lösung für die Bakterien.

Diese bestand aus:
Lahn'sche Lösung + 5% KS + o,5% NaTHio.
Am 5. Tag machten wir zur Kontrolle von jedem Röhrchen einen Ausstrich auf Leber-Agar anaerob, auf Blut-Platte aerob und fertigten je ein Gram-Präparat an.
Auf der Blut-Platte wuchsen ß-hämolysierende Kolonien, auf der Fortner-Platte die für B.b. typischen Kolonien. Im Gram-Präparat fanden sich nur gram-positive Stäbchen.
Um für die Struma-Kulturen die beste NaTHio-Konzentration zu ermitteln, ließen wir diese mit den verschieden zusammengesetzten Nährmedien laufen. Dazu mußten von den Zellen zunächst die Antibiotika entfernt werden. Wir gossen hierzu unter sterilen Bedingungen das ursprüngliche Me dium ab, spülten dann mit jeweils 1 ml antibiotikafreier Lösung zwei Mal die Röhrchen aus und gaben an = schließend 2 ml der verschieden konzentrier= ten Medien zu den Zellen. Die Grenze der NaTHio-Konzentration lag bei o,5%; obwohl o,o5% etwas besser für die Zellen war, nahmen wir für die endgültige Lösung o,5%, weil die günstigeren Bedingungen für das Bakterienwachstum die geringfügigere Schädigung der Zellen bei weitem überwog.

Um auszuschließen, daß bereits die Struma-Zellen das Bakterienwachstum hemmen, ließen wir nacheinander 3 Versuche laufen, bei denen wir in Röhrchen mit und ohne Struma-Kulturen und dem antibiotikafreien Nähr = medium, die Bakterien dazugaben. Zu diesem Zwecke wurden die Bakterien von der Zeissler-Platte in 1 ml Lahn'scher Lösung verrieben und dann mit der Pipette überimpft und zwar

0,1 ml pro Röhrchen. Wir verwendeten sowohl den Tissier- als auch den MAYER-Stamm, außerdem liefen Kontrollen ohne Bakterien mit.
Bereits nach einem Tag Bebrütung war eine Trübung festzustelln, die sich am 2. und 3. Tag noch verstärkte, während die Kontrollen klar blieben. Ein Unterschied in der Trübung zwischen den Röhrchen mit und ohne Struma-Kulturen war nicht festzustelln.
Am 3. Tag wurde von jedem Röhrchen ein Gram-Präparat angefertigt und Zeissler-Platten beimpft. Wir erhielten bereits nach einem Tag Bebrütung Kolonien mit ß-Hämolyse auf der Zeissler-Platte. In den Gram-Präparaten, sowohl in denen vom Röhrcheninhalt als auch in denen von den beimpften Platten, sahen wir die für B.b. typischen gram-positiven Stäbchen.

Von einer nur mit Tissier beimpften Kultur machten wir eine <u>Keimzählung</u> auf Zeissler-Platte. Dazu wurde ein Teil der Lösung mit NaCl verdünnt und zwar von 10^{-1} bis 10^{-5}. Von diesen Verdünnungen wurden je 0,03 ml auf 1/6 von je 2 Zeissler-Platten gebracht. Wir wollten damit prüfen, bei welcher Verdünnung schon Einzelkolonien auszuzählen sind und bei welcher Verdünnung keine Kolonien mehr auftreten. Diese Zahlen waren wichtig für spätere Vergleichszählungen. Die Kolonien nahmen bis zum 3. Bebrütungstag an Zahl zu, danach nur noch unwesentlich. Auszählbar waren die Verdünnungen 10^{-3} bis 10^{-5}.

Hauptversuche :

Mit diesen Vorversuchen hatten wir nun die günstigste Nährlösung ermittelt, und konnten mit großer Sicherheit annehmen, daß die Struma-Kulturen das Wachstum von B.b. nicht hemmen würden.

Für den 1. Hauptversuch benötigten wir insgesamt 18 Röhrchen. In jedem Röhrchen waren Struma-Kulturen (2 mal in antibiotika = freier Lösung ausgewaschen) in 2 ml des oben bereits besprochenen Nährmediums. In 6 Röhrchen wurden je o,1 ml der Tissier-, in 6 andere je o,1 ml der MAYER-7-Aufschwem = mung überimpft. Dann pipettierten wir zu je 2 Röhrchen mit Tissier bzw. MAYER-7 o,2 ml des 1:1o verdünnten Polio-Virus ($1o^7$ ID_{5o}/ml) und zu je zwei anderen mit Tissier bzw. MAYER-7 o,1 ml des unverdünnten Adeno-Virus. Die restlichen 4 Röhrchen benutzten wir als vergleichslösungen für das Bakterien = wachstum. Zur Kontrolle für etwaige Verun = reinigung und für die Virusaktivität beimpften wir je zwei Röhrchen nur mit der gleichen Menge Polio- bzw. Adeno-Virus. Außerdem liefen noch 2 Röhrchen ohne Viren und ohne Bakterien aus dem gleichen Grunde mit.

Tis	MAY	Po	Ad	Wachstum
+	-	-	-	+
+	-	+	-	+
+	-	-	+	+
-	+	-	-	+
-	+	+	-	+
-	+	-	+	+
-	-	+	-	-
-	-	-	+	-
-	-	-	-	-

Am 2. Bebrütungstag waren sämtliche Röhrchen ohne Bakterienbeimpfung noch völlig klar. Dabei war an den Struma-Kulturen bei Polio-Virus ein CPE (cytopathogener Effekt) von Stärkegrad 4 und bei Adeno-Virus von Stärkegrad 1 festzustellen.
Alle mit B.b. beimpften Röhrchen zeigten eine gleichmäßige Trübung. Es war zwischen den noch zusätzlich virushaltigen und den lediglich bakterienhaltigen Röhrchen kein Unterschied im Grad der Trübung festzustellen. Die Viren hatten also auf das Wachstum und die Vermehrung der Bakterien keinen Einfluß. Auch hatten die Bakterien keine Änderung der Form erfahren, was wir mittels der Gram - Färbung nachweisen konnten. Es bestand auch auf der anderen Seite keine offensichtliche Hemmung der Virusaktivität durch die Bak = terien. Der während des Hauptversuches aufgetretene CPE an den Struma-Kulturen entsprach vollkommen dem der vorherigen Kontrolle.
Bei dieser Aktivitätskontrolle mit Struma-Kulturen in normalem, antibiotikahaltigem Nährmedium zeigten die Polio- und auch die Adeno-Viren einen für diese Viren charak = teristischen CPE.

Wir hatten nun bei dem 1. Hauptversuch Bakterien und Viren zur gleichen Zeit in das neue Medium gegeben.
Im 2. Hauptversuch wollten wir einerseits den Bakterien Gelegenheit geben, sich allein an das neue Medium zu gewöhnen, bevor wir die Viren dazugaben, und andererseits die Viren in verschiedenen Vermehrungsstadien mit den Bakterien zusammenbringen. Es blieb

uns dafür nur jeweils eine Zeitspanne von 2 Tagen, da sonst die Struma-Kulturen durch das B.b. bzw. durch das Viruswachstum degeneriert wären.
Wir gaben also wieder, wie schon oben genauer erläutert, zu den Struma-Röhrchen die anti = biotikafreie Lösung. Wir benutzten zu diesem Versuch nur den auf Zeissler-Platte aerob weitergezüchteten Original-Stamm Tissier. Konzentration und Mengen waren die gleichen wie in den früheren Versuchen.

B.b.	Polio	Adeno	Wachstum
+	-	-	+
-	+	-	-
-	-	+	-
+	+ g	-	+
+	-	+ g	+
+	+ v	-	+
+	-	+ v	+
+	+ n	-	+
+	-	+ n	+

(Zeichenerklärung: g= die Viren wurden gleichzeitig mit den Bakterien verimpft;
v = diese Viren wurden einen Tag vor den Bakterien in die Röhrchen gegeben;
n = diese Viren wurden einen Tag nach den Bakterien verimpft.)

Am 2. Tag nach Versuchsbeginn war bereits in allen Röhrchen, außer den Viruskontrollen, eine Trübung festzustellen, die sich am 3. Tag noch verstärkte. Außerdem zeigten alle virushaltigen Röhrchen einen normalen CPE.

Am 3. Tag machten wir von allen Röhrchen, die eine Trübung zeigten, eine Gram-Färbung. In allen Präparaten waren nur die gram-positiven Stäbchen zu sehen, die nur die Diagnose B.b. zuließen. Eine Verunreinigung lag danach nicht vor.

Auch bei dieser Versuchsanordnung mußten wir also feststellen, daß durch die schon vor = handenen Viren die Bakterien nicht geschädigt und in ihrer Vermehrungstendenz nicht betroffen worden waren.

Der nur durch B.b. verursachte Intensitäts = grad der Trübung war in allen Röhrchen, soweit wir das mit dem Auge feststellen konnten, der gleiche. Um aber dieses Ergebnis quantitativ abzusichern, machten wir die bereits bei den Vorversuchen geschilderte Keimzählung.

Der Inhalt zweier mit gleichem Material beimpften Röhrchen wurde zusammengegeben und von dieser Mischung setzten wir die schon früher ermittelten günstigsten Verdünnungen von 10^{-3} bis 10^{-5} an.

Am 3. Bebrütungstag wurden die Kolonien ausgezählt. Ihre Anzahl auf den zueinander gehörenden Plattenpaaren war fast überall gleich. Die Verdünnung 10^{-3} war noch nicht auszuzählen, bei 10^{-4} lagen die Zahlen um 50 ± 10. Die Kolonienzahl bei Verdünnung 10^{-5} lag zwischen 8 und 11. Die Anwesenheit von Polio- bzw. Adeno-Viren hatte die Anzahl der Kolonien nicht beeinflußt. Auch bei den zu verschiedenen Zeiten zusammengegebenen Bakterien und Viren ließ sich kein Unter = schied feststellen.

Dieses Ergebnis bestätigte unsere an Hand der Trübung bereits aufgestellte Vermutung.

Nun wollten wir in einem Titrationsversuch prüfen, ob vielleicht bei geringerer Kon = zentration des B.b. die Viren eine zerstören = de bzw. hemmende Wirkung auf das Wachstum und die Vermehrung des B.b. ausüben. Wir benutzten dazu wieder Struma-Kulturen in unserem antibiotikafreien Medium und ließen 1/3 der Röhrchen ohne Viren, 1/3 mit Polio- und 1/3 mit Adeno-Viren. Als Bakterienverdünnung wählten wir 10^{-2} bis 10^{-6}, und zwar des auf Zeissler-Platte weitergezüchteten Tissier-Stammes. Wir gaben jeweils 0,2 ml der verschieden konzen = trierten Bakterienaufschwemmungen in jedes Röhrchen.

Bakt.-Verd.	Viren	Wachstum
10^{-2}	-	+
10^{-3}	-	+
10^{-4}	-	+
10^{-5}	-	+
10^{-6}	-	+
10^{-2}	Polio	+
10^{-3}	+	+
10^{-4}	+	+
10^{-5}	+	+
10^{-6}	+	+
10^{-2}	Adeno	+
10^{-3}	+	+
10^{-4}	+	+
10^{-5}	+	+
10^{-6}	+	+
-	Polio	-
-	Adeno	-
-	-	-

Am 3. Bebrütungstag waren die Kontrollen alle klar. In allen anderen Röhrchen war eine Trübung festzustellen, nur in Verdünnung 10^{-6} war sie kaum noch zu registrieren, und zwar bei den Röhrchen mit und ohne Viren. Die Trübung war jedoch am 4. Tag auch hier augenfällig geworden. Wir konnten also am 4. Tag überall eine Trübung konstatieren, deren Intensität nur vom jeweiligen Verdün = nungsgrad und nicht von der Virusbeimischung abhängig war. Es war uns somit nicht möglich, einen schädigenden Einfluß der Viren bei verschiedener Konzentration des B.b. nachzuweisen.

Um für die Bakterien ein Milieu zu schaffen, das den Wachstumsbedingungen im Darm etwas ähnlicher ist, gaben wir im 3. Hauptversuch zu unserem Medium Stuhlextrakt dazu. Für diesen Stuhlextrakt nahmen wir 6 Bifidum = stühle von Säuglingen der Kinderklinik, Homburg, schüttelten sie in o,9% iger NaCl auf und zentrifugierten das Ganze bei 4ooo U/min 12 min lang. Den Überstand saugten wir ab und ließen ihn durch ein bakteriendichtes Filter laufen. Den Durch = lauf versetzten wir mit 2% iger $NaHCO_3$, um auf einen p_H-Wert von 5,5 bis 6,3 zu kommen. Zur Sterilitätsprüfung des Extraktes verimpften wir einige Tropfen auf eine Blut-Agar-Platte und in Nährbouillon. Beide zeigten nach 2 Bebrütungstagen kein Kolonien = wachstum bzw. keine Verunreinigungen. Nun galt es zu testen, welche Konzentration dieses Stuhlextraktes die Struma-Kulturen noch einigermaßen vertragen würden. Wir setzten darum einen Versuch nur mit

Struma-Kulturen in unserem üblichen Medium an, und gaben vom Stuhlextrakt o,5 ml, o,2 ml jeweils unverdünnt, dann o,2 ml 1:5 verdünnt und o,2 ml 1:25 verdünnt hinzu. 3 Röhrchen ließen wir ohne jeden Zusatz. Nach 2 Bebrütungstagen war der Inhalt zwar klar geblieben, aber die Struma-Kulturen sahen alle, außer den Kontrollen, unschön aus. Sie hatten den Stuhlextrakt offenbar nicht gut vertragen. Ein signifikanter Unterschied war nicht zu sehen. Wir entschlossen uns daher, bei dem folgenden Versuch o,2 ml des unverdünnten Extraktes zuzugeben.

Der Hauptteil dieses 3. Versuches bestand nun aus 2 Teilen. Beide waren jeder für sich vergleichbar mit dem letzten Hauptversuch. Nur gaben wir im 2. Teil in jedes Röhrchen noch o,2 ml des Stuhlextraktes hinzu. Außerdem liefen noch 2 Röhrchen nur mit Struma und Nährmedium und 2 Röhrchen noch mit Stuhlzusatz als Kontrolle.

B.b.	Polio	Adeno	Stuhl	Wachstum
+	-	-	-	+
-	+	-	-	-
-	-	+	-	-
+	+ g	-	-	+
+	-	+ g	-	+
+	+ v	-	-	+
+	-	+ v	-	+
+	+ n	-	-	+
+	-	+ n	-	+

B.b.	Polio	Adeno	Stuhl	Wachstum
+	-	-	+	+
-	+	-	+	-
-	-	+	+	-
+	+ g	-	+	+
+	-	+ g	+	+
+	+ v	-	+	+
+	-	+ v	+	+
+	+ n	-	+	+
+	-	+ n	+	+
-	-	-	-	-
-	-	-	+	-

Am 2. und 4. Bebrütungstag waren sämtliche Kontrollen klar geblieben. Alle anderen Röhrchen zeigten eine Trübung, die keine Intensitätsunterschiede bei den verschieden zusammengesetzten Röhrcheninhalten erkennen ließ. Auch zeigten die stuhlhaltigen Röhrchen alle untereinander die gleiche Stärke der Trübung, was auch von den nicht stuhlhaltigen Röhrchen zu berichten ist. Von allen bakterienhaltigen Röhrchen dieses Versuches machten wir eine Keimzählung und zwar, wie oben schon erwähnt, auf 1/6 von je 2 Zeissler-Platten o,o3 ml der Verdün = nungen $1o^{-3}$ bis $1o^{-5}$.
Ausgezählt wurden die Platten am 2. und 3. Bebrütungstag und zwar nur die Verdünnung $1o^{-5}$. Die Anzahl der Einzelkolonien schwankte zwischen 5 und 2o, ohne, daß, wie schon im vorherigen Versuch, signifikante Unterschiede bei der verschiedenen Zusammen = setzung des Impfmaterials aufgefallen wären. Auch bei den Stuhlbeimengungen sah man keine aus dem Rahmen fallenden Zahlen.

Diskussion :

Zu dem Material und der Methodik unserer Versuche ist folgendes zu sagen.
Alle Versuche, die Vorversuche wie auch die Hauptversuche, wurden mehrmals mit dem gleichen Medium und unter den gleichen Bedingungen wiederholt, um einen nur zufäl = ligen Befund auszuschließen. Bei allen Versuchen liefen Kontrollröhrchen mit - Art und Anzahl siehe oben - die bis zum Ende jeden Versuches klar blieben. Von den trüb gewordenen Röhrchen machten wir bei jedem Versuch jeweils ein Gram-Präparat, um so eine etwaige Verunreinigung mit anderen Bakterien auszuschließen, die die Trübung hätten verursachen können. Diese Vermutung lag auf der Hand, da wir nur antibiotikafreie Medien verwenden konnten, und jedes Röhrchen manchmal mehr als 4 Mal im Verlauf des Versuches geöffnet werden mußte.
Die Sterilitätskontrolle des Stuhlextraktes wurde bereits früher besprochen.
Bei der Keimzählung wurden jeweils, wie oben angegeben, 2 Platten mit der gleichen Menge des gleichen Mediums beimpft, um die Mög = lichkeit ausschalten zu können, daß vielleicht gerade die eine Platte für das Wachstum optimalere Bedingungen geboten hätte.
Bereits zu Beginn unserer Vorversuche konnten wir die Fähigkeit des B.b., auch aerob zu wachsen, nachweisen. Wir bestätigten damit die Behauptung von MAYER, der dieses Phänomen, im Gegensatz zu anderen Autoren, die sich mit dem Wachstum von B.b. befassen, bereits in groß angelegten Versuchsreihen bewiesen hatte. Wir mußten zwar zu Beginn zwei Passagen abwarten, bis wir auf der Blut- bzw. Zeissler-Platte ein optimales

aerobes Wachstum des B.b. beobachten konnten. Nach dieser Zeit aber hatte es sich an die neuen Bedingungen vollständig adaptiert und zeigte während der ganzen Versuchs = serien eine klar ausgeprägte ß-Hämolyse. Es steht somit also fest, daß das B.b. nur ein fakultativer Anaerobier ist, der auch bei O_2-Zutritt bestens gedeiht.
Dieses Ergebnis erleichterte uns natürlich wesentlich die Weiterzüchtung, da ja das anaerobe Fortner-Verfahren doch komplizierter und auch zeitraubender ist.

Die Struma-Kulturen, die zur Züchtung von Viren verwendet wurden, und auch das fremde Medium hatten keinen Einfluß auf das Wachs = tum bzw. die Vermehrung von B.b.. Zwar sahen die Bakterien nach der 1. Passage im Gram-Präparat kleiner aus als normal. Aber schon nach den nächsten Passagen zeigten sie sich wieder in ihrer charakteristischen Form.

Bei der wahl des Mediums scheint uns noch wichtig zu erwähnen, daß der Zusatz von NaTHio einen auffällig günstigen Einfluß auf die Vermehrung des B.b. ausübt, da es eine Verschiebung zu "halbanaeroben" Verhältnissen bewirkt.

Alle 3 Hauptversuche und auch die Titration führten ohne Ausnahme nur zu einem Ergebnis: nämlich, daß das bloße Nebeneinander von B.b. und Polio- bzw. Adeno-Viren in einem für beide Teile angebrachten Medium weder die Vermehrung der Bakterien hemmt, noch die Aktivität der Viren herabsetzt. Damit konnten wir also eine unmittelbar schädigende

Wirkung der Viren auf das B.b. bzw. seine Vermehrung ausschließen.

Ganz im Gegensatz zu unseren in vitro Versuchen steht aber nun die Erfahrung, daß das B.b. bei einem Virusinfekt des Säuglings an Zahl sofort zurückgeht. Es bleibt also die Frage, welche Mechanismen im Darm zu einer Zerstörung der Bifidumflora führen, die man in vitro nicht nachweisen kann.
Wir haben zwar durch Zugabe des Stuhlextraktes versucht, ein dem Darm ähnliches Milieu zu schaffen. Dieser Stuhlextrakt war aber von uns völlig steril gemacht worden. Dadurch waren also auch andere Bakterien entfernt worden, die vielleicht im Darm durch den Viruskatarrh in ihrem Wachstum und ihrer Vermehrung begünstigt werden und dann eine verdrängende Wirkung auf das B.b. ausüben.

Außerdem wäre es denkbar, daß bereits das durch den Infekt veränderte Milieu im Darm eine Vermehrung des B.b. vollständig hemmt. Eine mögliche Ursache liegt vielleicht im B.b. selbst. Wir wissen nicht, ob es durch die Passagen in einem künstlichen Milieu nicht widerstandsfähiger wurde als es im Darm ist, wo seine Umweltbedingungen ganz andere sind. Es wäre daher möglich, daß der Viruskatarrh ein Milieu erzeugt, welches für das B.b. äußerst schlecht ist. Unter diesen sehr ungünstigen Lebensbedingungen könnte es nun anfällig werden für eine mögliche Schädigung durch die Viren.
Noch eine andere Möglichkeit wäre zu erwä = gen. Wir sprechen zwar von einer Polio- bzw. Adeno-Infektion; aber wäre es nicht möglich,

daß mit diesen bekannten und nachweisbaren Viren andere unbekannte Viren vergesellschaftet sind, die eine Noxe für das B.b. darstellen.
Eventuell spielt auch die Pathogenität des Virus eine Rolle bei der Schädigung des B.b. WIGAND, MAYER und Mitarbeiter konnten nämlich nachweisen, daß bei der oralen Schluckimpfung mit abgeschwächtem Polio-Virus (Sabin Typ 1) der Reinheitsgrad der Bifidumflora im Darm nicht gestört wird bei Ernährung mit Frauenmilch bzw. Bifidummilchnahrung.

Welche der aufgezählten Ursachen nun zutrifft oder ob mehrere zusammenwirken, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Zusammenfassung :

In den Vorversuchen wurde das günstigste Medium für das gemeinsame Wachstum von B.b. und den Struma-Kulturen gefunden. Es bestand aus: Lahn'scher Lösung + 5% Kalbsserum + o,5% Na-Thioglycolat.
In dieses Medium wurden zuerst die Bakterien gleichzeitig mit den Polio- bzw. Adeno-Viren gegeben. Beide, Bakterien und Viren, wuchsen unter diesen Bedingungen völlig normal. Es war keine Beeinträchtigung der Vermehrungstendenz von B.b. nachzuweisen, weder optisch durch den Grad der Trübung noch durch die Zählung der Kolonien auf den beimpften Zeissler-Platten.
Auch in den verschiedenen Wachstumsstadien zusammengebrachte Viren und Bakterien störten sich gegenseitig nicht in ihrer Vermehrung. Selbst eine nur ganz geringe Bakterienkonzentration wurde von den im Übermaß vorhandenen Viren nicht geschädigt, was durch Titrationsversuche bewiesen wurde. Auch Hinzufügen von Stuhlextrakt zu den Kulturen änderte nichts an den Ergebnissen. Bei allen Versuchen blieb das B.b. unbe = schädigt und vermehrte sich bei Zusatz von Viren im gleichen Außmaß wie ohne Viren.

Literatur

1. ADAM, A.: Jb. Kinderheilk. 110, 186 (1925)
Säuglingsenteritis. Georg Thieme-Verlag Stuttgart (1956)

2. BESSAU, G.: Mschr. Kinderheilk. 68, 297 (1937)
Mschr. Kinderheilk. 92, 137 (1943)

3. BOVENTER, K.: Erg. Hyg. 26, 193 (1949)

4. BRAUN, O.H.: Z. Kinderheilk. 81, 742 (1958)
Zbl. Bakt. I. Orig. 174, 390 (1959)
Z. Kinderheilk. 83, 690 (1960)
Ärztl. Sammelblätter 49, Heft 2 (1960)
Mschr. Kinderheilk. 109, 162 (1961)
Medizin und Ernährung 3, 83 (1962)

5. CATEL, W.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med., S. 75
63. Kongreß 1957

6. DEHNERT, J.: Zbl. Bakt. I. Orig. 169, 66 (1957)
I. Mitteilung: Zbl. Bakt. I. 163, 57 (1957
II. Mitteilung: Zbl. Bakt. I. 169, 66 (1957
Ann. Paediat. (Basel) 192, 195 (1959)
Bakteriologische Untersuchungen als Beitrag zum Bifidumproblem.
Habilitationsschrift, Heidelberg (1962)
Ann. Nestle 19, 29 (1962)

7. FRISELL, E.: Acta Paediatr. (Uppsala) suppl. 80 (1951)

8. GROSS, H. und MACKO, K.: Arch. Kinderheilk. 158, 214 (1958)

9. GUTHOF, O.: Zbl. Bakt. 1. Orig. 17o, 327 (1957)

o. HAENEL, H.: Zbl. Bakt. 1. Ref. 176, 3o5 (196o)
Ernährungsforschung V, 1 (196o)

1. HAENEL, H., SCHMIDT, E.F. und FELDHEIM, G.: Zschr. Kinderheilk. 82, 595 (1959)

2. HERRMANN, W.: Zbl. Bakt. I. Orig. 17o, 316 (1957/58)

3. KLEINSCHMIDT, H.: Jb. Kinderheilk. 11o, 257 (1925)
Österr. Kinderheilk. 3, 55 (1949)
Mschr. Kinderheilk. 1o1, 1o2 (1953)

4. KOCH, A.: The experimental elimination of symbionts and its consequences.
Experimental Parasitology V, 481 (1956)
Grundlagen und Probleme der Symbiose = forschung, in Medizinische Grundlagen = forschung Bd. IV, 64
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1962)

5. KULP and WHITE : Sciences 76, 17 (1932)

6. LERCHE, M. und REUTER, G.: Zbl. Bakt. I. Orig. 182, 324 (1962)

7. LIEBSCHER, S.: Z. Kinderheilk. 85, 265 (1961)

8. MALYOTH, G. und BAUER, A.: Z. Kinderheilk. 73, 93 (1953)

9. MALYOTH, G., BAUER, A. und SERICK, E.: Klin. Wschr. 451 (195o)

o. MALYOTH, G. und SPANIER, J.: Münch. med. Wschr. 6o7 (195o)

21. MANCIAUX, M.: Bifidibacterium bifidum. Ses facteurs de croissance. Essais d'implantation chez le nourrisson. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1958)

22. MAYER, J.B.: Z. Kinderheilk. 65, 293 (1948)
Mschr. Kinderheilk. 97, 42o (1949)
Mschr. Kinderheilk. 98, 189 (1949)
Ergeb. Inn. Med. u. Kinderheilk. N.F. 7, 429 (1956)
Mschr. Kinderheilk. 393, 1o8 (196o)
Pädiatrie und Pädologie 1, Heft 2 (1965)

23. MAYER, J.B., DITTMANN, J. und UMLAUF, O.: Z. Kinderheilk. 9o, 237 (1964)
Z. Kinderheilk. 91, 151 (1964)
Z. Kinderheilk. 148, 92 (1965)

24. MAYER, J.B., TEWEES, S., BLUTA, U. und DITTMANN, J.: Z. Kinderheilk. 94, 141 (1965)

25. MOSER, L.: Die Typendifferenzierung des Thermobacte = rium bifidum. Inaugural - Dissertation, Homburg (1948)

26. OCKLITZ, H.W. und SCHMIDT, E.F.: Arch. Kinderheilk. 16o, 147 (1959)
Zbl. Bakt. I. Orig. 174, 4o2 (1959)

27. OLSEN, E.: Studies on intestinal flora of infants. E. Munksgaard, Kopenhagen (1949)

28. PETUELY, F.: Dtsch. med. wschr. 82, 1957 (1957)

29. RAYNAUD, M. und QUINTINI, J.: Ann. Pédiat. 35, 24 (1959)

3o. RAYNAUD, M. und LEVESQUE, J.: Ann. Pédiat. 35, 27 (1959)

31. ROMAHN, A.: Papierchromatographische Untersuchungen der Aminosäuren im Zellhydrolysat von Bacterium bifidum. Inaugural - Dissertation, Homburg (1961)

32. SEELIGER, H.P.R.: Zbl. Bakt. I. Orig. 170, 288 (1957/58)
Ärztl. Wschr. 82, 736 (1957)

33. SEELIGER, H.P.R. u. WERNER, H.: Zschr. Hyg. 148, 383 (1962)

34. STENGER, K. und WOLF, H.: Die Bedeutung des Bacterium bifidum für den Säuglingsorganismus. Arch. Kinderheilk. Beih. 46, Enke-Verlag, Stuttgart (1962)

35. TISSIER, H.: Thèse Méd. Paris, 1899-1900
Ann. Institut Pasteur 19, 109 (1905)
C. R. Soc. Biol. (Paris) 60, 359 (1906)
Ann. Institut Pasteur 22, 189 (1908)

36. THURAU, K.: Über den Aminosäurehaushalt bei Säuglings = dystrophie. Arch. Kinderheilk. Beih. 33, Enke-Verlag, Stuttgart (1956)

37. WERNER, H. und SEELIGER, H.P.R.: Path. Mikrobiologie 26, 53 (1963)
Zbl. Bakt. I. Orig. 188, 345 (1963)

38. WIGAND, R., MAYER, J.B., ABABIO, A.K., BAUER, H., LANG, F., ADAM, W. und SCHMIDT, W.A.K.: Arch. Kinderheilk. 173, 7-15 (1965)

D a n k s a g u n g

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. J.B. Mayer, möchte ich danken für die freundliche Überlas = sung des Themas.
Der Leiter der Virologischen Abteilung, Herr Prof. Dr. R. Wigand, stand mir bei der Aus = führung der Experimente jederzeit mit Rat und Hilfe zur Seite.
Bei beiden Professoren möchte ich mich auf diesem Wege herzlich für Ihre Bemühungen bedanken.

L e b e n s l a u f

Am 1. Mai 1943 wurde ich in St.Wendel/Saar als Tochter des Stadtbauamtsrates Fritz Wachter und seiner Ehefrau Liesel geb. Hallauer geboren. Meine Eltern und ich besitzen die deutsche Staatsangehörigkeit.

Im Herbst 1949 kam ich in die Volksschule in St.Wendel. Von Herbst 1953 bis Ostern 1962 besuchte ich das staatliche Mädchenrealgymnasium in St.Wendel, wo ich am 17.3.1962 meine Reifeprüfung ablegte.

Im Sommer-Semester 1962 und im Winter-Semster 1962/63 war ich an der Universität des Saarlandes für das Studienfach Medizin immatrikuliert. Während des Sommer-Semsters 1963 studierte ich in München, wo ich am 29.1o.1963 das Vorphysikum machte. Vom Winter-Semester 1963/64 bis einschließlich Winter-Semester 1964/65 war ich wieder an der Universität des Saarlandes eingeschrieben. Dort bestand ich am 8.4.1965 mein Physiukum.

Das Sommer-Semester 1965 studierte ich an der Universität Düsseldorf. Zum Winter-Semester 1965/66 schrieb ich mich wieder an der Universität des Saarlandes ein.

Dort legte ich am 22.7.1968 das Medizinische Staatsexamen ab.

ROTAPRINT-OFFSETDRUCKEREI

6602 Dudweiler · Scheidter Straße 26
Telefon Sulzbach 7 32 84
Drucksachen aller Art · Fotokopien
Spezialgebiet: Druck v. Dissertationen